

韓国産生薬に含まれる抗炎症活性物質の prostaglandin E2産生抑制作用機序解明に関する研 究

著者	金 容必
号	292
発行年	2000
URL	http://hdl.handle.net/10097/15827

氏 名 (本籍) きむ よん びる
金 容 必

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 博 第 2 9 2 号

学位授与年月日 平 成 13 年 3 月 26 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 、 専 攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 製薬化学専攻

学 位 論 文 題 目 韓国産生薬に含まれる抗炎症活性物質の
prostaglandin E₂ 産生抑制作用機序解明に関する研究

論文審査委員 (主 査)
教授 大 内 和 雄 教授 中 畑 則 道

教授 大 島 吉 輝

論文内容要旨

Prostaglandin (PG) は微量で非常に多彩な生理活性を示すオートコイドの一つであり、主にマクロファージから産生される PGE_2 は炎症、血管新生、骨吸収などにおいて重要な役割を果たしている。Arachidonic acid (AA) は、主に細胞膜リン脂質の2位の炭素にエステル結合しており、phospholipase A_2 (PLA_2) が作用することによりリン脂質から遊離する。 PLA_2 は細胞質型 PLA_2 や分泌型 PLA_2 など数種の分子群から成る酵素であり、刺激の違いにより関与する酵素分子が異なることが示唆されている。

Cyclooxygenase (COX) は細胞膜リン脂質から遊離した AA から PGG_2 を介して PGH_2 に変換する酵素で、COX-1 及び COX-2 の2種類の isoform がある。COX-1 はほとんど全ての種類の細胞に恒常的に発現し、それによって産生される各種 PG は細胞の housekeeping に関与していると考えられている。これに対して COX-2 は、血清、proinflammatory cytokine、bacterial lipopolysaccharide あるいは protein kinase C の活性化薬である 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) などの刺激によりマクロファージ、線維芽細胞、あるいは炎症誘発部位などで誘導され、それによって各種の PG や thromboxane などの prostanoids の産生が上昇する。Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) である aspirin や indomethacin は、COX-1 と COX-2 の両方を非特異的に抑制する。このような非特異的な COX-1/COX-2 阻害薬は、胃や腎に副作用を誘発するが、これは housekeeping gene product である COX-1 の阻害によるものと考えられている。従って、COX-1 活性を阻害しないで COX-2 活性のみを選択的に阻害する薬物は、従来の非ステロイド抗炎症薬に比べて副作用の少ない抗炎症薬になると考えられる。しかし、COX 阻害薬により COX 活性を抑制すると、COX-2 タンパク質の発現が増強されたり、一時的に PGE_2 産生が亢進することが報告されている。また、これまで開発されている COX-2 阻害薬が濃度が高くなると COX-1 活性も抑制してしまうことがあり、投与量をコントロールしないと、従来の COX-1/COX-2 非選択的阻害薬と同様な副作用が起こる可能性がある。そこで、COX 活性を直接阻害せずに PG 産生を抑制する作用機序を持つより選択性の高い新しい抗炎症薬の開発を目的として、ラット腹腔マクロファージの培養系において COX-2 タンパク質の発現誘導に基づく PGE_2 産生を抑制する化合物の探索を行った。はじめに、抗炎症活性のある韓国産生薬 *Belamcanda chinensis* の茎の抽出画分には、PKC 活性化薬 TPA や Ca^{2+} -dependent ATPase 阻害薬 thapsigargin による PGE_2 産生亢進を抑制する作用があることを明らかにし、その本体が isoflavone 骨格を持つ二つの化合物、tectorigenin 及びその 7-O-glucoside の tectoridin であることを見出した。さらに、tectorigenin 及び tectoridin による PGE_2 産生抑制作用について解析を行った結果、tectorigenin 及び tectoridin には COX-1 及び COX-2 活性を直接抑制する作用はなく、細胞膜リン脂質から AA を遊離させる PLA_2 活性に対しても抑制する作用はなかった。しかし、TPA あるいは thapsigargin により発現誘導される COX-2 タンパク質を Western blot 法で検出した結果、tectorigenin 及び tectoridin は COX-2 タンパク質の発現誘導を抑制する作用があることが明らかになった (第1章)。一方、東洋医学において鎮咳、咽喉痛及び炎症などの治療に用いられている韓国産生薬 *Platycodon grandiflorum* の抽出画分から単離された platycodin D にも TPA 刺激による PGE_2 産生亢進を抑制する作用があることを明らかにし、platycodin D による PGE_2 産生抑制作用について解析を行った。

その結果、platycodin DにはCOX-1/COX-2活性及びPLA₂を直接抑制する作用はなく、TPAによるCOX-2タンパク質の発現誘導を抑制してPGE₂産生を抑制する作用があることを明らかにした（第1章）。これらの結果から、韓国産生薬 *Belamcanda chinensis* 及び *Platycodon grandiflorum* はその中に含まれる tectorigenin, tectoridin 及び platycodin Dが炎症局所においてCOX-2タンパク質の発現誘導を抑制することによりPGE₂産生を抑制し、それによって抗炎症活性を示すことが示唆された。

イギリスのブーツ社は aspirin の抗炎症活性に注目し、aspirin の化学修飾を行い、aspirin より優れた抗炎症、鎮痛、解熱作用を持つ ibuprofen を合成開発した。リード化合物に化学修飾を行い、より優れた化合物を得るためには、リード化合物において活性を発現する部位の化学構造を明らかにすることが重要である。そこで、韓国産生薬の一つである *Pueraria thunbergiana* の花及び根から単離された tectorigenin の各種構造類似体（isoflavone 種）9種類についてTPA刺激により亢進するPGE₂産生に対する抑制効果について構造活性相関を調べた結果、isoflavone の5-hydroxyl基、7-hydroxyl基、6-methoxyl基及び4'-hydroxyl基または4'-methoxyl基がPGE₂産生抑制効果の発現に重要であること、及び7-hydroxyl基がglycosylationされて配糖体になるとPGE₂産生抑制作用は低下することが明らかになった。また、最も活性の強い isoflavone は tectorigenin 及び irisolidone であることが明らかになった（第2章）。なお、tectorigenin 以外の isoflavone によりPGE₂産生抑制作用はそれらの化学構造の類似性から考えて tectorigenin と同様にCOX-2タンパク質の発現誘導を抑制するためであると想定されるが、詳細な機序については今後検討する必要がある。

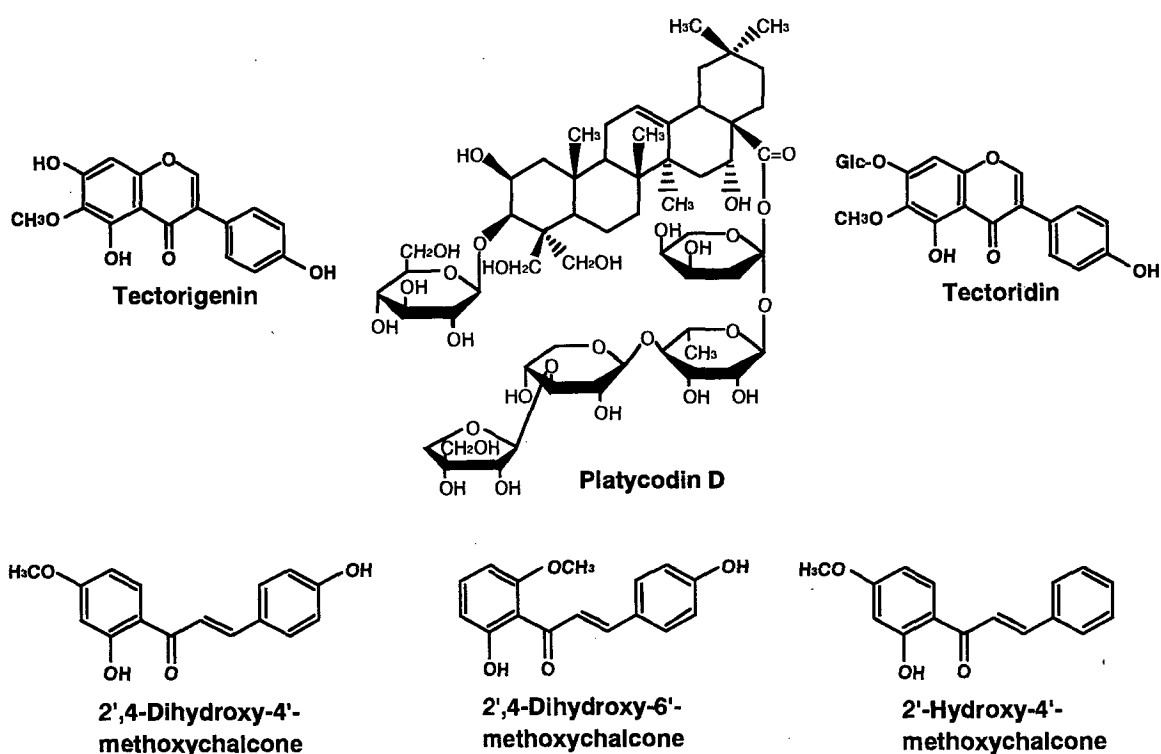
炎症性細胞において細胞外からの刺激を受けてCOX-2を発現誘導する際には、protein tyrosine kinase (PTK), MAP kinase あるいはNF- κ Bなどの細胞内シグナル伝達分子がその発現誘導に深く関わっているとされているが、どのように関与しているかについては、不明な点が多く残されている。また、炎症性刺激によるCOX-2タンパク質の発現誘導はステロイド性抗炎症薬 dexamethasone により抑制されること、及びCOX-2阻害薬には抗炎症作用が認められていることから、COX-2は炎症反応の進展に大きく関与しており、その発現機構を明らかにすることは新しい抗炎症薬の開発において極めて重要である。

TectorigeninにはCOX-2タンパク質の合成誘導を抑制することによりPGE₂産生を抑制する作用があることを明らかにした（第1章）ので、その作用機序について解析を行った。その結果、tectorigeninによるCOX-2タンパク質の発現抑制作用はNF- κ Bの活性化を抑制してCOX-2 mRNAレベルを低下させることによって生じることが示唆された。また、tectorigeninによるNF- κ Bの活性化の抑制は、p44/42及びp38 MAP kinase経路を介さずに、何らかのPTK経路を抑制することによって生じることが示唆された（第3章）。

炎症性細胞は様々な刺激によってCOX-2タンパク質を発現誘導するが、COX-2タンパク質の発現誘導を抑制することによってPGE₂などの起炎症性prostanoidの産生を抑制する物質は、COX-2の選択的阻害薬と同様に副作用が少ない新しい作用機序を持った抗炎症薬になり得ることが考えられた。COX-2タンパク質の発現誘導を抑制する物質を探索する研究の過程で、ある種の2'-hydroxychalcone誘導体にその活性があることを見出したので、化学合成された14種類の2'-hydroxychalcone誘導体のPGE₂産生抑制作用について調べ、構造活性相関を解析した。その結果、4'-methoxyl基あるいは6'-methoxyl基はPGE₂産生抑制作用を発現するために必要であることが明らかになった（第4章）。また、2'-hydroxychalcone誘導体の中で強い

PGE₂産生抑制作用を示した2'-hydroxy-4'-methoxychalcone, 2',4-dihydroxy-4'-methoxychalcone及び2',4-dihydroxy-6'-methoxychalconeの作用機序を解析した結果, これらの化合物はtectorigeninと同様にTPAによりCOX-2タンパク質の合成誘導を抑制することによりPGE₂産生を抑制する作用があることが明らかになった(第4章)。

韓国産生薬に含まれる抗炎症活性成分並びに化学合成されたchalcone誘導体の中からCOX-2タンパク質の発現誘導を抑制することによりPGE₂の産生を強く抑制する化合物として見出されたtectorigenin及び2'-hydroxy-4'-methoxy-chalconeなどの下記の化合物は, COX-2の選択的阻害薬と同様に副作用が少ない新しい作用機序を持つNSAIDsのリード化合物になる可能性があるものと思われる。



審査結果の要旨

本研究は、韓国産生薬に含まれる抗炎症活性物質の作用機序の解明を目指し、特に cyclooxygenase (COX)-2 タンパク質の発現を抑制する機序について明らかにすることにより、新しい抗炎症薬の開発に役立つ理論を構築しようとするものである。

まず、抗炎症薬として使用されている韓国産生薬の一つである *Belamcanda chinensis* の茎から抽出した画分から tectorigenin 及び tectoridin を単離した。次いで、これらの化合物について、炎症反応の増強因子である prostaglandin (PG) E₂ の産生に対する作用をラット腹腔マクロファージの培養系により解析し、これらの化合物には TPA あるいは thapsigargin 刺激によって亢進する PGE₂ 産生を抑制する作用があることを明らかにした。また、同じく抗炎症薬として使用されている韓国産生薬 *Platycodon grandiflorum* から単離された platycodin D についても同様に PGE₂ 産生抑制作用があることを明らかにした。さらに、これらの化合物による PGE₂ 産生抑制機序について解析した結果、これらの化合物には COX-1 あるいは COX-2 の酵素活性を直接抑制する作用及び細胞膜リン脂質からのアラキドン酸遊離を抑制する作用はなく、COX-2 タンパク質の合成誘導を抑制することによって PGE₂ 産生を抑制する作用があることを明らかにした。

次に、tectorigenin による PGE₂ 産生抑制作用を、他の植物から単離された9種類 isoflavone 誘導体の作用と比較して構造活性相関を調べた結果、isoflavone の6位の methoxyl 基及び5位の hydroxyl 基が PGE₂ 産生抑制作用の発現に重要であること、及び7位の O-glycosyl 基は PGE₂ 産生抑制作用を低下させる作用があることを明らかにした。

次に、tectorigenin による COX-2 タンパク質の誘導抑制作用機序について解析した結果、tectorigenin は protein tyrosine kinase の活性化を抑制し、NF- κ B の核移行を抑制することにより COX-2 タンパク質の遺伝子発現を抑制する作用があることを明らかにした。

最後に、2'-hydroxychalcone の各種合成誘導体についてマクロファージの培養系により PGE₂ 産生抑制効果を調べた結果、4'位の methoxyl 基及び6'位の methoxyl 基が PGE₂ 産生抑制効果の発現に重要であることを明らかにした。また、2'-hydroxy-4'-methoxychalcone を用いて作用機序を解析した結果、その化合物は tectorigenin と同様に COX-2 タンパク質の合成誘導を抑制することにより PGE₂ 産生を抑制することを明らかにした。

本研究により、COX-2 タンパク質の合成誘導を抑制する作用機序を持つリード化合物が見い出され、本研究成果は新しい抗炎症薬を開発するために役立つ理論の構築に貢献するところが極めて大きいと思われる。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。